



B

EFW

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Art Unit : 1645 Customer No.: 035811
Examiner : Albert Mark Navarro
Serial No. : 09/755,456
Filed : January 5, 2001
Inventors : Frederic Delbac
: Christian Vivares Docket No.: 1566-00
: Antoine Danchin
Title : MICROSPORIDIAN POLAR
: TUBE PROTEINS, NUCLEIC
: ACIDS CODING FOR THESE
: PROTEINS AND THEIR
: APPLICATIONS Confirmation No.: 5009
Not. Of Allow.: 12/28/04
Dated: March 7, 2005

Mail Stop Issue Fee
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

Certificate of Mailing Under 37 CFR 1.8

For

Postcard

Claim for Priority Under 35 U.S.C. §119

Certified Copy of French Patent Application No. 98/08692

Transmittal Letter

Executed Supplemental Declarations (2)

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as First Class Mail in an envelope addressed to Mail Stop Issue Fee, Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450, on the date appearing below.

Name of Applicant, Assignee, Applicant's Attorney
or Registered Representative:

DLA Piper Rudnick Gray Cary US LLP
Customer No. 035811

By:

Date:

7 MAR 2005

THIS PAGE BLANK (USPTO)



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Art Unit	: 1645	Customer No.:	035811
Examiner	: Albert Mark Navarro		
Serial No.	: 09/755,456		
Filed	: January 5, 2001		
Inventors	: Frederic Delbac		
	: Christian Vivares	Docket No.:	1566-00
	: Antoine Danchin		
Title	: MICROSPORIDIAN POLAR		
	: TUBE PROTEINS, NUCLEIC		
	: ACIDS CODING FOR THESE	Confirmation No.:	5009
	: PROTEINS AND THEIR	Not. Of Allow.:	12/28/04
	: APPLICATIONS	Dated:	March 7, 2005

CLAIM FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. §119

Mail Stop Issue Fee
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

We submit herewith the certified copy of French Patent Application No. 98/08692, filed July 7, 1998, the priority of which is hereby claimed.

Respectfully submitted,

T. Daniel Christenbury
Reg. No. 31,750
Attorney for Applicants

TDC:cc
(215) 656-3381



THIS PAGE BLANK (USPTO)



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 31 JAN. 2005

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Planche', is written over a horizontal line.

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

07. JUL 1998

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98 08692 -

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

DATE DE DÉPÔT

07.07.98

1

**NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE**

BREESE-MAJEROWICZ
3, avenue de l'Opéra
75001 PARIS

n° du pouvoir permanent

références du correspondant

téléphone

C9B1906FR

01.47.03.67.77

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande
de brevet européen

☒ demande initiale

☐ brevet d'invention

☐ certificat d'utilité n°

date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐

oui

☐

non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

PROTEINES DE TUBE POLAIRE DE MICROSPORIDIE, ACIDES NUCLEIQUES CODANT POUR
CES PROTEINES ET LEURS APPLICATIONS.

3 DEMANDEUR (S)

n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

Centre National de la Recherche Scientifique -CNRS-

Forme juridique

Nationalité (s) FRANCAISE

Adresse (s) complète (s)

Pays

FRANCE

3, rue Michel Ange
75794 PARIS Cedex 16

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire)

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

Pierre BREESE
921038

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

CO09B1906FR

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98/08692

TITRE DE L'INVENTION :

PROTEINES DE TUBE POLAIRE DE MICROSPORIDIE, ACIDES NUCLEIQUES CODANT POUR
CES PROTEINES ET LEURS APPLICATIONS.

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

BREESE MAJEROWICZ
3, avenue de l'Opéra
75001 PARIS

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

DELBAC Frédéric
37, rue Corot
63000 CLERMONT-FERRAND
FRANCE

DANCHIN Antoine
108, boulevard August Blanqui
75013 PARIS

VIVARES Christian
Résidence du Parc, Bât. D
84, boulevard F. Mitterrand
63000 CLERMONT-FERRAND
FRANCE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

921038
BREESE Pierre

Paris le 14/09/1999

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDEICATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
32			α	4/11/98	16 NOV. 1998 - SR
28-31	32		α	03/10/02	04 DEC. 2002 - VD

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention «R.M.» (revendications modifiées).

1

PROTEINES DE TUBE POLAIRE DE MICROSPORIDIE,
ACIDES NUCLEIQUES CODANT POUR CES PROTEINES ET LEURS
APPLICATIONS.

5

L'invention a pour objet des protéines complètes purifiées de tube polaire (PTPs) de microsporidie ainsi que les gènes codant ces protéines, et leur utilisation dans les domaines du diagnostic.

10

E. cuniculi est une microsporidie, parasite intracellulaire obligatoire, fréquente chez de nombreux mammifères et impliquée dans diverses infections chez l'homme principalement chez les sujets immunodéprimés. De manière générale, les microsporidies sont responsables chez les patients sidéens de pathologies digestives, mais aussi d'atteintes oculaires, musculaires, hépatiques, de rhinosinusites et d'infections systémiques (1). Des tests sérologiques ont également montré la présence importante des microsporidies chez les patients immunocompétents, puisque atteignant 8% de la population (2). Actuellement, 4 genres de microsporidie sont responsables de maladies humaines : *Enterocytozoon*, *Encephalitozoon*, *Vittaforma* et *Trachipleistophora*. L'émergence de ces parasites en pathologie humaine suscite de la part des chercheurs un intérêt grandissant dans les domaines systématique, épidémiologique, clinique, du diagnostic et de la thérapeutique.

15

20

25

30

Actuellement, le diagnostic repose sur des tests PCR à partir d'oligonucléotides déterminés d'après les séquences d'ADN ribosomal, seules séquences connues chez la plupart des microsporidies. La thérapeutique, quant à elle, est limitée à l'utilisation de certaines molécules telles que l'albendazole ou la fumagilline.

35

Ces eucaryotes unicellulaires présentent un mécanisme d'invasion unique. La spore, stade infectieux, renferme en effet un appareil d'extrusion constitué d'un tube polaire inséré à son extrémité antérieure dans un disque d'ancrage. Sous l'effet de certains stimuli, pouvant être liés *in vitro* à une variation du pH, à l'osmolarité, à la présence de cations ou d'anions, le tube polaire est extrudé de la spore microsporidienne et traverse la membrane plasmique d'une cellule-hôte. Le sporoplasme, expulsé à travers ce tube, est ainsi inoculé dans la cellule réceptrice. Cet appareil invasif, spécifique des microsporidies et unique dans le monde vivant, suscite donc un intérêt à la fois d'un point de vue fondamental mais aussi appliqué pour le diagnostic et la thérapeutique.

A ce jour, aucune séquence complète de protéines constituant ce tube polaire n'a été obtenue. Selon Weidner (3) le tube polaire serait constitué d'une seule protéine de 23 kDa chez *Ameson michaelis*. Plus récemment, chez une microsporidie parasite de poisson, *Glugea americanus*, une extraction différentielle des protéines en présence d'un agent réducteur (DTT) a permis de mettre en évidence qu'une protéine de 43 kDa est constitutive du tube polaire, mais seule une partie de la séquence N-terminale de 16 acides aminés a été déterminée (4).

La production d'anticorps polyclonaux et monoclonaux a également été réalisée contre le tube polaire de différentes espèces (5, 6, 7), montrant une possible hétérogénéité protéique de cette structure.

Les travaux de recherche ayant conduit à la présente invention ont tout d'abord consisté à produire des anticorps polyclonaux et monoclonaux contre le tube polaire d'*E. cuniculi*. Il a ainsi obtenu 2 anticorps polyclonaux (anti-55 kDa et anti-35 kDa) et un anticorps

monoclonal (anti-55 kDa) réagissant spécifiquement avec le tube polaire en immunofluorescence et en microscopie électronique (6). Après séparation des protéines sporales par électrophorèse en 2 dimensions et transfert sur membrane PVDF une protéine ayant une masse moléculaire apparente proche de 55kDa et un point isoélectrique de 5 était reconnue par ces trois types d'anticorps. Sur ces gels de 2 dimensions, une autre protéine de masse moléculaire apparente proche de 35 kDa et avec un point isoélectrique de 9 était également reconnue par 2 anticorps anti-tube polaire, l'anticorps polyclonal anti-35 kDa et l'anticorps monoclonal.

Les travaux de recherche réalisés dans le cadre de la présente invention ont donc permis, pour la première fois, d'obtenir des protéines complètes de tube polaire de microsporidie. Les travaux présentés par les Inventeurs à l'occasion d'un congrès (Fifth International Workshops on Opportunistic Protists and Fifth General Meeting of the European Concerted Action on Pneumocystis Research, Lille 3-7 septembre 1997) sur l'obtention d'une protéine de tube polaire de 55 kDa sont insuffisants pour effectivement permettre l'obtention de cette protéine complète et purifiée et pour identifier, cloner et séquencer le gène correspondant. En effet, aucune donnée de séquence nucléique ou protéique n'apparaît dans le document relatant ce congrès (8). Le protocole expérimental qui y figure comprend des étapes classiques et bien connues de l'homme du métier (9), telles que l'extraction des protéines sporales, les électrophorèses (SDS-PAGE), la production d'anticorps polyclonaux et monoclonaux, le microséquençage de peptides ainsi que la détermination d'amorces dégénérées et leur amplification par PCR. Compte-tenu du caractère synthétique du document relatant ce congrès, son enseignement est insuffisant

pour permettre à l'homme du métier de reproduire les travaux des Inventeurs et de mettre en évidence la séquence complète d'une protéine complète de tube polaire de microsporidie.

5

L'invention a donc pour objet une protéine complète purifiée de tube polaire de microsporidie et plus particulièrement de la microsporidie *E. cuniculi*.

Plus particulièrement l'invention concerne :

10

- une protéine de masse moléculaire apparente d'environ 55 kDa et un point isoélectrique de l'ordre de 5,

15

- une protéine de masse moléculaire apparente d'environ 35 kDa et un point isoélectrique de l'ordre de 9.

20

Dans un second temps, les travaux réalisés sur les deux protéines purifiées ci-dessus ont consisté à les soumettre à un microséquençage interne après digestion par l'Endolysine C. Deux peptides ont ainsi été séquencés (P1 : ATALCSNAYGLTPGQQGMAQ et P2 : SATQYAMEACATPTP) pour la protéine de 55 kDa et un peptide P3: AVQGTDRCILAGIID) pour la protéine de 35 kDa, et ont permis à partir d'amorces dégénérées d'amplifier

25

une partie des gènes correspondants.

En l'absence de banque génomique, les Inventeurs ont réussi à déterminer les séquences des gènes et leurs régions flanquantes par une technique de SSP-PCR (10). Ces différentes étapes ont permis de

30

définir la structure complète des gènes, leurs particularités ainsi que les similitudes éventuelles avec d'autres gènes. Les structures primaires des protéines de 55 et 35 kDa ont également été déterminées.

35

L'invention concerne donc les protéines de tube polaire de microsporidie dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en

annexe sous les numéros SEQ ID No:1 ou SEQ ID No:2, un fragment ou un dérivé fonctionnellement équivalent de celles-ci.

On entend par dérivé fonctionnellement équivalent, les protéines dont la séquence comprend une modification et/ou une suppression et/ou une addition d'un ou plusieurs résidus d'acides aminés, dès lors que cette modification et/ou suppression et/ou addition ne modifie pas la fonction de ces protéines. De tels dérivés peuvent être analysés par l'homme du métier selon les techniques :

- de criblage de banques d'expression à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines du tube polaire, ou

- de criblage de banques génomiques à l'aide de sondes nucléiques capable de s'hybrider à un gène codant pour une protéine du tube polaire.

La protéine de 395 acides aminés, ci-après désignée PTP55, représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No:1 correspond à la protéine de 55 kDa. Elle présente une masse moléculaire déduite de 39 609 Da et de 37 230 Da sans le peptide signal, qui est inférieure à celle de 55 000 observée sur gels de polyacrylamide. Cette protéine est synthétisée par *E. cuniculi* sous la forme d'un plus grand précurseur dont la séquence signal de 22 acides aminés est éliminée lors du ciblage vers des vésicules impliquées dans la formation du tube polaire. La séquence d'une protéine mature du tube polaire de l'invention correspond donc à la séquence comprise entre les acides aminés en position 23 et 395 de SEQ ID No:1. Plusieurs caractéristiques de peptide signal sont en effet observées :

- structure secondaire prédite comme formant une hélice α ,

- présence d'acides aminés hydrophobes ainsi que de résidus basiques proches de la partie N-terminale,

- absence d'un résidu lysine en position 22,
5 et

- prédiction de peptide signal par l'algorithme de von Heijne (11).

De plus, le séquençage N-terminal de la protéine a montré une séquence identique à celle du peptide P1, confirmant que le peptide de 22 acides aminés était clivé lors de la maturation.

On observe en outre que la PTP55 ne contient pas de résidus tryptophane, phénylalanine, ni arginine. Elle présente un point isoélectrique déduit de 4,7 en accord avec celui observé sur gels de polyacrylamide en 2 dimensions qui était de l'ordre de 5. L'étude de ces séquences de 395 acides aminés et de 373 acides aminés dans la protéine mature, montre qu'elle ne présente aucune homologie significative avec d'autres protéines déjà décrites dans les banques de données.

La protéine de 277 acides aminés, désignée ci-après PTP35, représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No:2 correspond à la protéine de 35 kDa. Elle présente une masse moléculaire déduite de 30 075 Da, inférieure donc à celle de 35 000 observée sur gels de polyacrylamide. L'extrémité N-terminale de la PTP35 présente également des caractéristiques de peptide signal :

- structure secondaire prédite comme formant une hélice α ,

- présence d'acides aminés hydrophobes ainsi que de résidus basiques,

- prédiction de peptide signal par l'algorithme de von Heijne (11).

De la même manière que pour la PTP55, la PTP 35 d'*E. cuniculi* présenterait un peptide signal. Des

sites potentiels de clivage protéolytiques peuvent être prédits entre les résidus 12 et 13, 13 et 14 ou 22 et 23. Cependant un tel clivage ne pourrait être confirmé que par le séquençage de la partie N-terminale de la protéine. Sur la base des données disponibles, la séquence d'une protéine de tube polaire selon l'invention est comprise entre les acides aminés 1 et 277 de la séquence donnée en annexe sous le numéro SEQ ID No :2.

La PTP35 ne contient pas de résidus tryptophane. Elle présente un point isoélectrique déduit de 8,6 en accord avec celui observé sur gels de polyacrylamide en 2 dimensions qui était de l'ordre de 9. L'étude de cette séquence de 277 acides aminés montre qu'elle ne présente aucune homologie significative avec d'autres protéines déjà décrites dans les banques de données.

Des anticorps poly ou monoclonaux dirigés contre au moins une protéine de l'invention ou un fragment de celles-ci peuvent être préparés par les méthodes décrites dans la littérature. Les anticorps polyclonaux sont formés selon les techniques classiques par injection des protéines, extraites à partir des spores d'*E. cuniculi* ou produites par transformation d'un hôte, à des animaux, puis récupération des antisérums et des anticorps à partir des antisérums par exemple par chromatographie d'affinité. Les anticorps monoclonaux peuvent être produits en fusionnant des cellules de myélomes avec des cellules de rates d'animaux préalablement immunisés à l'aide des protéines de l'invention. Ces anticorps sont utiles pour rechercher d'autres protéines de tubes polaires d'*E. cuniculi*, d'*E. hellem* ou d'*E. intestinalis*. et pour étudier la parenté entre les protéines de tubes polaires de différentes espèces, voire de différents genres. En

effet, les anticorps formés contre le tube polaire d'*E. intestinalis* ou d'*E. hellem* donnant lieu à des réactions immunologiques croisées avec les protéines du tube polaire d'*E. cuniculi*. Mais ils peuvent aussi trouver des applications dans le domaine diagnostique.

L'invention concerne donc aussi un procédé de diagnostic des infections provoquées par les microsporidie du genre *Encephalitozoon* comprenant les étapes suivantes :

a) on immobilise une protéine recombinante de tube polaire de microsporidie selon l'invention sur un support d'analyse tel qu'une feuille de nitrocellulose ou une plaque ELISA,

b) on sature les sites aspécifiques de réaction, par exemple en présence de lait écrémé 5%,

c) on incube le produit obtenu à l'étape (b) avec les anticorps du sérum du sujet à tester, de manière à ce que, si le sérum contient des anticorps dirigés contre une protéine de tube polaire de microsporidie, ceux-ci se complexent à ladite protéine,

d) on élimine par lavage les anticorps du sérum qui ne sont pas complexés à l'étape (c),

e) on incube le produit de l'étape (d) avec des anticorps secondaires anti-humains couplés à une molécule permettant leur révélation, comme par exemple un enzyme tel que la peroxydase ou à un fluorochrome,

f) on élimine par lavage les anticorps anti-humains qui ne sont pas liés spécifiquement et

g) on révèle par tout moyen approprié les complexes anticorps anti-humains / anticorps du sérum / protéine formés à l'étape (e).

Un kit de diagnostic pour la mise en oeuvre d'un tel procédé est constitué par :

- un support d'analyse sur lequel sont immobilisées des protéines recombinantes de tube polaire de microsporidie,

5 - une solution contenant des anticorps anti-humains couplés à une molécule permettant leur révélation, et

- une notice comportant les étapes du procédé de diagnostic décrit plus haut.

10 L'invention se rapporte également à une molécule d'acide nucléique comprenant ou constituée par une séquence nucléique codant pour une protéine de tube polaire de microsporidie. Plus particulièrement, l'invention se rapporte aux séquences nucléotidiques
15 codant pour les protéines de PTP55 et PTP35 correspondant respectivement aux protéine de 55 et 35 kDa de la microsporidie *E. cuniculi*.

L'invention envisage à titre spécifique, une molécule d'acide nucléique comprenant ou constituée par
20 une séquence nucléique codant pour une protéine de tube polaire de microsporidie dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No:1 ou SEQ ID No:2 un fragment ou un dérivé fonctionnellement équivalent de
25 cette protéine.

Une molécule d'ADN comprenant la séquence codant pour la protéine PT55 est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:1 ou sa séquence complémentaire. Plus particulièrement,
30 une telle séquence d'acide nucléique comprend la séquence comprise entre les nucléotides 411 et 1532 de SEQ ID No:1 ou sa séquence complémentaire. La séquence nucléique de SEQ ID NO:1 est composée de 1830 nucléotides et comprend un cadre de lecture ouvert de
35 1188 paires de bases allant de la position 345 (codon d'initiation ATG) à la position 1532 (codon stop TAG).

La région précédant la position 345 est susceptible de comprendre des éléments utiles à la transcription de la protéine PT55 telle qu'une région promotrice.

Une molécule d'ADN comprenant la séquence
 5 codant pour la protéine PTP35 est représentée dans la
 liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:2
 ou sa séquence complémentaire. Plus particulièrement,
 une telle séquence d'acide nucléique comprend la
 10 séquence comprise entre les nucléotides 458 et 1291 de
 SEQ ID No:2 ou sa séquence complémentaire. La séquence
 nucléique II de l'invention est composée de 1740
 nucléotides et comprend un cadre de lecture ouvert de
 834 paires de bases allant de la position 458 (codon
 d'initiation ATG) à la position 1291 (codon stop TAA).
 15 La région précédant la position 458 est susceptible de
 comprendre des éléments utiles à la transcription de la
 protéine PT35 telle qu'une région promotrice.

L'invention concerne les molécules d'acide
 nucléique dont les séquences nucléotidiques sont
 20 représentées dans la liste de séquence en annexe sous
 les numéros SEQ ID NO:1 et SEQ ID NO: 2 ainsi que toutes
 séquences nucléotidiques capables de s'hybrider avec
 celles-ci. En effet, l'invention concerne bien entendu
 aussi les séquences nucléotidiques dérivées de SED ID
 25 NO:1 et SEQ ID NO: 2 par exemple du fait de la
 dégénérescence du code génétique, et qui code pour des
 protéines présentant des caractéristiques de tube
 polaire de microsporidie.

30 L'invention concerne également un vecteur
 comprenant au moins une molécule d'acide nucléique
 précédente, avantageusement associée à des séquences de
 contrôle adaptés, ainsi qu'un procédé de production ou
 d'expression dans un hôte cellulaire d'une protéine de
 35 tube polaire de microsporidie de l'invention ou d'un
 fragment de celle-ci. La préparation de ces vecteurs

ainsi que la production ou l'expression dans un hôte des protéines de l'invention peuvent être réalisées par les techniques de biologie moléculaire et de génie génétique bien connues de l'homme du métier.

5 A titre d'exemple, un procédé de production d'une protéine de tube polaire de microsporidie selon l'invention consiste :

10 - à transférer une molécule d'acide nucléique de l'invention ou un vecteur contenant ladite molécule dans un hôte cellulaire,

- à cultiver ledit hôte cellulaire dans des conditions permettant la production de la protéine de tube polaire de microsporidie,

15 - à isoler, par tous moyens appropriés les dites protéines.

A titre d'exemple, un procédé d'expression d'une protéine de tube polaire de microsporidie selon l'invention consiste :

20 - à transférer une molécule d'acide nucléique de l'invention ou un vecteur contenant ladite molécule dans un hôte cellulaire,

- à cultiver ledit hôte cellulaire dans des conditions permettant l'expression desdites protéines.

25 L'hôte cellulaire mis en oeuvre dans les procédés précédents peut être choisi parmi les procaryotes ou les eucaryotes et notamment parmi les bactéries, les levures, les cellules de mammifères, de plantes ou d'insectes.

30 Le vecteur utilisé est choisi en fonction de l'hôte dans lequel il sera transféré; il peut s'agir de tout vecteur comme un plasmide.

35 L'invention concerne donc aussi les hôtes cellulaires et plus particulièrement les bactéries transformées comme *E. coli*, exprimant des protéines de tube polaire de microsporidie obtenues conformément aux procédés précédents.

L'invention concernant également les sondes nucléiques et oligonucléotides préparés à partir des molécules d'acide nucléique de l'invention.

5 Ces sondes, avantageusement marquées, sont utiles pour la détection par hybridation de séquences similaires chez d'autres microsporidies. Selon les techniques classiques, ces sondes sont mises en contact avec un échantillon biologique. Différentes techniques d'hybridation peuvent être mises en oeuvre telles que
10 l'hybridation sur taches (Dot-blot) ou l'hybridation sur répliques (technique de Southern) ou autres techniques (DNA chips). De telles sondes constituent des outils permettant de détecter rapidement des séquences similaires dans les gènes codant pour les protéines de
15 tube polaire de microsporidie ce qui permettrait d'étudier l'origine et la conservation de ces protéines constituant le tube polaire.

Les oligonucléotides sont utiles pour des expériences de PCR par exemple pour rechercher des gènes
20 dans d'autres microsporidies ou dans un but de diagnostic.

L'invention concerne donc aussi un procédé de diagnostic des infections provoquées par des microsporidies, comprenant les étapes suivantes :

25 a) on extrait de l'ADN de spores microsporidiennes prélevées dans des échantillons biologiques provenant des urines, des selles, ou d'une biopsie,

30 b) on amplifie l'ADN extrait par tout moyen approprié tel qu'une PCR à l'aide d'oligonucléotides spécifiques déduits des séquences des gènes codant pour les protéines de tube polaire de microsporidie,

c) on immobilise les produits d'amplification sur un support d'analyse,

35 d) on détermine l'origine microsporidienne des produits d'amplification par hybridation à l'aide

d'une sonde nucléotidique marquée spécifique d'une microsporidie.

Il est possible de réaliser l'étape (c) par fixation des produits d'amplification sur un support d'analyse, tel qu'une membrane ou une plaque ELISA.

Un kit de diagnostic pour la mise en oeuvre d'un tel procédé est constitué par

- les moyens nécessaires à l'amplification des séquences codant pour les protéines de tube polaire de microsporidie, tels que des oligonucléotides spécifiques de ces séquences, et tous les autres éléments nécessaires à la réalisation d'une PCR.

- un support d'analyse pour fixer les produits de l'amplification, et

- des sondes marquées spécifiques d'une microsporidie.

L'invention se rapporte également à des compositions vaccinales capables de prévenir les infections provoquées par les microsporidie du genre *Encephalitozoon* comprenant à titre de principe actif une protéine de l'invention ou un fragment de celle-ci en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

En effet, les anticorps formés contre le tube polaire d'*E. intestinalis* ou d'*E. hellem* donnant lieu à des réactions immunologiques croisées avec des protéines de tube polaire d'*E. cuniculi*, l'invention fournit avantageusement un vaccin potentiel contre les infections provoquées par les microsporidies du genre *Encephalitozoon*.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent concernant la production d'anticorps contre le

tube polaire, le clonage et le séquençage des gènes codant pour des protéines de tube polaire chez *E. cuniculi*, et qui se rapportent aux dessins en annexe dans lesquels :

5 - La figure 1 montre :

• A : la séparation électrophorétique des protéines sporales par SDS-PAGE avec sur la piste 1 la fraction soluble dans SDS 2%, 2-mercaptoéthanol 10%, et sur la piste 2 la fraction résiduelle obtenue après
10 incubation dans du 2-mercaptoéthanol 50% pendant 48 heures.

• B : l'analyse par immunofluorescence indirecte à l'aide d'anticorps polyclonaux dirigés contre la bande de 55 kDa séparée par SDS-PAGE (dilution 1/50^e) sur des cellules MRC-5 infestées par
15 *Encephalitozoon cuniculi*. Les spores avec leur tubes polaires extrudés sont fortement marquées.

• C : l'immunoblot avec l'anticorps polyclonal anti-55kDa (dilution 1/5000^e, piste 1) et
20 l'anticorps monoclonal Ec 102 (dilution 1/10000^e, piste 2). Les marqueurs de poids moléculaires (M) sont indiqués sur la gauche et sont donnés en kDa. Les blots ont été révélés en utilisant un kit ECL (Amersham).

25 - La figure 2 montre l'immunoréactivité de la protéine de 55 kDa. L'électrophorèse sur gel deux dimensions a été réalisée en utilisant l'isoélectrofocalisation dans la première dimension et des gels de 12% dans la deuxième dimension. Les
30 protéines séparées ont été soit colorées au nitrate d'argent (A) soit transférées sur des membranes de PVDF et incubées avec les anticorps polyclonaux dirigé contre le spot acide de 55 kDa (dilution 1/5000^e) isolé par électrophorèse 2D (B).

35 Les poids moléculaires sont indiqués en kDa et les points isoélectriques numérotés de 4 à 8.

On observe en (C) le marquage spécifique des tubes polaires extrudés en immunofluorescence avec ce même anticorps.

5 - la figure 3 illustre l'expression de la PTP55 chez *Escherichia coli*. On distingue en A, l'analyse sur gels de polyacrylamide (SDS-PAGE) des protéines extraites de bactéries transformées avec la construction plasmidique pQE30-PTP55. La piste 1 montre la production sans induction ; la piste 2 après induction à l'IPTG et la piste 3 la PTP recombinante purifiée sur résine Ni-NTA.

10 On distingue en B un immunoblotting avec les sérums dirigés contre la PTP55 recombinante (dilution 1/1000^e). Sur la piste 1, les protéines d'*E.coli* 4 heures après induction IPTG ; sur la piste 2 les protéines d'*Encephalitozoon cuniculi*.

15 On distingue en C un marquage en immunofluorescence indirecte, avec les antisérums dirigés contre la PTP55 recombinante des tubes polaires d'*E.cuniculi*. Les tubes polaires extrudés sont indiqués par des flèches.

20 On distingue en D un immunomarquage à l'or colloïdal en microscopie électronique à transmission des sections de tube polaire.

25 La figure 4 montre un immunomarquage réalisé sur des gels d'électrophorèse en 2 dimensions avec l'anticorps monoclonal dirigé contre le tube polaire.

30 L'électrophorèse sur gel de deux dimensions a été réalisée en utilisant l'isoélectrofocalisation dans la première dimension et des gels de 12% dans la deuxième dimension. Les protéines séparées ont été soit colorées au nitrate d'argent (A) soit transférées sur des membranes de PVDF et incubées avec l'anticorps monoclonal (dilution 1/5000^e) (B). Les spots de 55 et 35 kDa sont indiqués par des flèches.

La figure 5 illustre l'expression de la PTP35 chez *Escherichia coli*. La figure 5 montre :

- en A, l'analyse sur gels de polyacrylamide (SDS-PAGE) des protéines extraites de bactéries transformées avec la construction plasmidique pQE30-PTP35.. La piste 1 montre la production sans induction ; la piste 2 après induction à l'IPTG et la piste 3 la PTP recombinante purifiée sur résine Ni-NTA.

Les marqueurs de poids moléculaires sont indiqués en kDa

- en B, un immunoblotting avec les sérum dirigés contre la PTP35 recombinante (dilution 1/1000^{ème})

Sur la piste 1 on distingue le profil électrophorétique d'*Encephalitozoon cuniculi* coloré au bleu de Coomassie.

Sur la piste 2 est illustré le marquage d'une protéine de 35 kDa d'*E. cuniculi* avec l'anticorps dirigé contre la protéine recombinante de 35 kDa exprimée chez *Escherichia coli*.

- en C, le marquage en immunofluorescence indirecte, avec les antisérums dirigés contre la PTP35 recombinante, des tubes polaires d'*E. cuniculi*. La flèche indique un tube polaire extrudé.

1) Production d'anticorps contre le tube polaire d'*E. cuniculi*, analyses immunocytochimiques.

La souche d'*E. cuniculi* utilisée est un isolat de souris. Elle est entretenue sur culture cellulaire MDCK. Les spores libérées dans le surnageant de culture sont récupérées et stockées à 4°C dans du PBS. L'extraction des protéines sporales est réalisée par broyage des spores avec des billes de zirconium (0.1mm de diamètre) dans un tampon contenant 2.5% de SDS et 10% de 2-mercaptoéthanol en présence d'inhibiteurs de protéases. Après dénaturation par la chaleur 10 minutes

à 100°C, les débris sporaux sont éliminés par centrifugation à 18000g pendant 5 minutes. Les protéines sont ensuite séparées par SDS-PAGE sur des gels de polyacrylamide 12%.

5 Pour l'électrophorèse en 2 dimensions, les échantillons protéiques sont solubilisés dans un tampon à base d'urée 9M, de 2-mercaptoéthanol 5% et de CHAPS 40mM. L'isoélectrofocalisation est réalisée dans les conditions suivantes: 4 heures à 400 V, 30 minutes à 600
10 V puis 30 minutes à 800 V avec la combinaison d'ampholines (Pharmacia) 40% pH 3-10, 60% pH 4-6.5. Après équilibration des gels de première dimension dans du SDS / 2-mercaptoéthanol pendant 10 minutes, les protéines sont séparées selon leur masse moléculaire par
15 SDS-PAGE. Les gels correspondants sont colorés soit à l'argent soit au bleu de Coomassie, ou transférés sur membrane PVDF (Immobilon P, PolyLabo) en utilisant un système semi-sec.

20 Les anticorps polyclonaux ont été produits contre différentes protéines d'*E. cuniculi* séparées par électrophorèse. Des injections intrapéritonéales sont réalisées chez des souris BALB/c pour chaque échantillon protéique. La bande protéique de 55 kDa a également été utilisée pour produire des anticorps monoclonaux. Ainsi,
25 3 anticorps dirigés contre le tubé polaire ont été obtenus: 2 anticorps polyclonaux anti-35 kDa et anti-55 kDa et un anticorps monoclonal anti-55 kDa.

L'immunoblotting, l'immunolocalisation en IFA et en microscopie électronique à transmission sont
30 réalisés selon les techniques classiques.

2) Microséquencage de PTPs de masses moléculaires apparentes 55 kDa et 35 kD.

35 La séquence N-terminal ainsi que 2 peptides internes (P1 et P2) ont été séquencés pour la PTP55.

N-terminal : ATALCSNAYG

P1 : ATALCSNAYGLTPGQQGMAQ

P2 : SATQYAMEACATPTP

Un peptide interne (P3) a été séquencé pour
la PTP35.

P3 : AVQGTDRCILAGIID

Ces séquences ont été réalisées à partir des protéines de 55 kDa et de 35 kDa isolées par électrophorèse en 2 dimensions, par le laboratoire de
microséquençage des protéines, Institut Pasteur,
Département des biotechnologies.

Pour le séquençage interne des peptides P1, P2 et P3, les protéines ont été préalablement digérées par l'Endolysine C, enzyme protéolytique coupant après un résidu lysine.

3) Amplification PCR, clonage et séquençage des gènes codant pour les PTPs.

a) Gène codant pour la PTP55.

A partir d'amorces dégénérées déduites des peptides P1 et P2, un fragment d'ADN d'environ 1 kpb a été amplifié, cloné dans un vecteur plasmidique pCR2 (Invitrogen, TA cloning vector) et séquencé selon la méthode de Sanger (12). L'amplification des régions 5' et 3' du gène de la PTP a été réalisée par une technique de PCR (SSP-PCR). L'analyse des séquences est réalisée sur le serveur de biologie moléculaire Infobiogen.

La séquence complète représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO:1 comprend 1830 nucléotides et comporte un cadre de lecture de 1188pb. Ce dernier contient 395 codons allant du site considéré comme étant le site d'initiation de la traduction au codon de terminaison TAG. Le codon considéré comme codon ATG de départ est précédé par une région particulièrement riche en A-T. La séquence en

acides aminés traduite est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO:1.

b) Gène codant pour la PTP35.

5 A partir d'amorces dégénérées déduites du peptide P3, différents fragments ont été amplifiés par la technique de SSP-PCR, clonés dans un vecteur plasmidique pGEMT (Promega, TA cloning vector), séquencés selon la méthode de Sanger et analysés comme décrit ci-dessus.

10 La séquence complète représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO:2 comprend 1740 nucléotides. Le cadre de lecture comporte 834 pb. Ce dernier contient 277 codons allant du site
15 considéré comme étant le site d'initiation de la traduction au codon de terminaison TAA. Le codon considéré comme codon ATG de départ est précédé par une région particulièrement riche en A-T, similaire à celle de la PTP55. La séquence d'acides aminés traduite est
20 représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:2.

4) Expression des PTPs chez *Escherichia coli*.

25 Une partie de la PTP55 correspondant à la région entre les peptides P1 et P2 a été clonée dans un vecteur d'expression pQE30 (Qiagen) et exprimée chez *E. coli* (souche M15). La protéine recombinante a été purifiée par chromatographie d'affinité sur colonnes de
30 nickel et injectée à des souris. Les anticorps correspondants testés en immunoblotting, immuno-fluorescence et en microscopie électronique à transmission ont permis de confirmer que cette protéine était bien localisée au niveau du tube polaire d'*E.*
35 *cuniculi*.

Une partie de la PTP35 entre les résidus 27 et 277 a également été exprimée chez *E. coli* selon la même technique. Les anticorps produits contre cette protéine recombinante ont montré un marquage du tube polaire.

5) Analyse des séquences primaires des PTP55 et PTP35.

L'analyse Blast n'a montré aucune homologie significative avec d'autres protéines connues, si ce n'est avec le collagène, principalement dû au fait que la PTP55 est riche en résidus glycine et proline.

a) La PTP55 est riche en résidus proline, glycine, glutamine, sérine et thréonine qui représentent à eux 5 plus de 55% du contenu en acides aminés. Le site de clivage (entre les résidus sérine et alanine) proposé est prédit comme tel par les caractéristiques suivantes:

- absence de résidu lysine en position 22 précédant le peptide P1 séquencé (23-42) après digestion de la protéine par l'Endolysine C,
- séquençage N-terminal de la protéine correspondant à celui du peptide P1,
- présence d'acides aminés hydrophobes dans cette région N-terminal,
- algorithme de von Heijne,
- structure secondaire en hélice α .

La PTP est vraisemblablement synthétisée par *E. cuniculi* sous forme d'un plus grand précurseur dont la séquence signal de 22 acides aminés est éliminée lors de la maturation. La protéine mature aurait donc une masse moléculaire de 37230 Da.

Des sites de N-glycosylation (NETS, NGTS et NISG) sont présents dans la séquence. La présence de

nombreux résidus sérine et thréonine (21,6%) laisse également supposer des sites de O-glycosylation.

La région centrale de la protéine PTP55 est caractérisée par 4 répétitions en tandem de 26 acides aminés chacune avec une conservation au niveau nucléique. Cette région est partiellement encadrée par 2 autres répétitions de 9 acides aminés.

b) La PTP35 est particulièrement riche en résidus lysine (11,5%) et acide glutamique (9%). 3 sites de clivages potentiels d'une séquence signal sont représentés entre les résidus 12 et 13, 13 et 14, et 22 et 23. Une séquence RGD est présente dans la PTP35, séquence que l'on retrouve dans des protéines telles que la fibronectine et qui intervient dans des phénomènes d'attachement cellulaire. Un site potentiel de N-glycosylation (NSTS) est également présent dans la séquence.

6) Localisation chromosomique et estimation du nombre de copies.

L'hybridation d'une sonde, correspondant à une partie du gène codant pour la PTP55, sur les chromosomes d'*E. cuniculi* séparés par électrophorèse en champs pulsé a montré une localisation unique de ce gène sur le chromosome VI.

La même sonde a été appliquée sur des Southern après digestion de l'ADN génomique d'*E. cuniculi* par différentes enzymes de restriction : Une seule bande est marquée sur chaque profil de digestion, ce qui permet d'affirmer que le gène existe en une seule copie.

Le gène codant pour la PTP35 est également localisé sur le chromosome VI.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 5 1) Desportes-Livages, Parasite (1996) 3:
107-113.
- 2) Van Gool et al, J Infect Dis (1997) 175:
1020-1024.
- 3) Weidner, J Cell Biol (1976) 71: 23-34.
- 10 4) Keohane et al, Mol Biochem Parasitol
(1996) 79: 255-259.
- 5) Beckers P.J.A. et al, J. Clin.
Microbiol. (1996) 34: 282-285.
- 15 6) Delbac et al, J Euk Microbiol (1998) 45: → X₂
224-231.,
- 7) Keohane et al, J Euk Microbiol (1996) 43:
26-31.
- 20 8) Delbac et al, J Euk Microbiol (1997) 44: → X₁
77S.
- 9) Watson et al, ADN recombinant, Ed
Bruxelles (1994).
- 25 10) Shyamala and Ames, Methods Enzymol
(1993) 217: 436-446
- 11) von Heijne, Nucl. Acids Res. (1986) 14:
4683-4690.
- 30 12) Sanger et al, Proc Natl Acad Sci USA
(1977) 74: 5463-5467.
- 13) Land et al, Parasitology Today (1995)
35 11: 19-23.

LISTE DE SÉQUENCES

(1) INFORMATION GÉNÉRALES:

5 (iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 2

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:1 :

(i) CARACTÉRISTIQUES DE LA SEQUENCE:

10 (A) LONGUEUR:
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRIN: double
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

15 (ix) CARACTÉRISTIQUES
(A) NOM/CLE:
(B) EMPLACEMENT:

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCES: SEQ ID NO:1 :

20 GAATTCAGAT GCCTCATACC TTGGGATTAA AAAATTGATG TTCATTTGTT ATATATCCTG 60
GGCGGACAGG CCGGCTCGTA TTCTTCAGGG GTGTCGCCTA CCCAGTGCAC AGGAGGTTCC 120
25 GGAGGTGTCT TGGATGGAAA GTAAGGCCAT TTGTGGGTTT TCATCCATGT CATCGTCCCT 180
TTCGGCTGTT TCACCAAGAT CCAATTATTC CTCCAGGACT TTCAACCCTC AGAATGGAAA 240
30 CAGAGATGAA ACTCTCTGTG CAAATCGTAG ATATCGATTG GAGACATTGA AACCACGGAG 300
TTTGAAATAA AAGTATAAAT ACCTCCGAAA ACGCAGAGTT TAAG ATG AAA GGT ATT 356
Met Lys Gly Ile
1
35 TCT AAG ATC CTC TCT GCC TCT ATT GCC CTG ATG AAG TTG GAG AAT GTC 404
Ser Lys Ile Leu Ser Ala Ser Ile Ala Leu Met Lys Leu Glu Asn Val
5 10 15 20
40 TAT TCA GCA ACC GCA CTG TGC AGC AAT GCA TAT GGC CTA ACT CCG GGA 452
Tyr Ser Ala Thr Ala Leu Cys Ser Asn Ala Tyr Gly Leu Thr Pro Gly
25 30 35
CAA CAG GGT ATG GCT CAG CAG CCG TCG TAT GTG CTG ATC CCC AGC ACC 500
Gln Gln Gly Met Ala Gln Gln Pro Ser Tyr Val Leu Ile Pro Ser Thr
45 40 45 50
CCG GGA ACC ATA GCA AAC TGT GCA AGC GGT TCA CAG GAC ACA TAT TGT 548
Pro Gly Thr Ile Ala Asn Cys Ala Ser Gly Ser Gln Asp Thr Tyr Ser
55 60 65
50 CCT TCT CCC GCT GCA CCC ACA TCT CCA GTG ACT CCG GGG AAA ACT AGC 596
Pro Ser Pro Ala Ala Pro Thr Ser Pro Val Thr Pro Gly Lys Thr Ser
70 75 80
55 GAG AAT GAG ACA TCT CCA TCG GCT CCT GCA GAA GAT GTA GGA ACA TGC 644
Glu Asn Glu Thr Ser Pro Ser Ala Pro Ala Glu Asp Val Gly Thr Cys
85 90 95 100

	AAG ATT GCC GTA TTG AAG CAC TGC GAC GCA CCA GGA ACA ACA TCA GGG Lys Ile Ala Val Leu Lys His Cys Asp Ala Pro Gly Thr Thr Ser Gly 105 110 115	692
5	ACG ACA CCA GGG TCA GGG CCT TGT GAA ACC CCA GAG CAG CAA CAG CCT Thr Thr Pro Gly Ser Gly Pro Cys Glu Thr Pro Glu Gln Gln Gln Pro 120 125 130	740
10	TTG TCA GTG ATC TCC ACC ACT CCT GCC GTA CCG GTG ACT GTG GAG TCT Leu Ser Val Ile Ser Thr Thr Pro Ala Val Pro Val Thr Val Glu Ser 135 140 145	788
15	GCA CAG TCT CCA TCT GTT GTG CCA GTT GTT CCT GTC GTT GCT CAC CAC Ala Gln Ser Pro Ser Val Val Pro Val Val Pro Val Val Ala His His 150 155 160	836
20	CAG GCA GTT CCA GGC TAC TAC AAC AAT GGA ACA TCC GGT ATT CCT GGA Gln Ala Val Pro Gly Tyr Tyr Asn Asn Gly Thr Ser Gly Ile Pro Gly 165 170 175 180	884
	CAG CAA CAG ATC CTT TCT GGC ACT CTT CCC CCA GGA GCC ACT TTG TGT Gln Gln Gln Ile Leu Ser Gly Thr Leu Pro Pro Gly Ala Thr Leu Cys 185 190 195	932
25	CAG GGA CAG GCC ATG CCT AGC ACT CCT GGA CAG CAA CAG ATC CTT TCT Gln Gly Gln Ala Met Pro Ser Thr Pro Gly Gln Gln Gln Ile Leu Ser 200 205 210	980
30	GGC ACT CTT CCC CCA GGG GTC ACT TTG TGT CAG GGA CAG GCC ACG CCT Gly Thr Leu Pro Pro Gly Val Thr Leu Cys Gln Gly Gln Ala Thr Pro 215 220 225	1028
35	AGC ACT CCT GGG CAG CAA CAG GTC CTT TCT GGC ACT CTT CCC CCA GGA Ser Thr Pro Gly Gln Gln Gln Val Leu Ser Gly Thr Leu Pro Pro Gly 230 235 240	1076
40	GTC ACT TTG TGT CAG GGA CAG GCC ACG CCT AGC ACT CCT GGG CAG CAA Val Thr Leu Cys Gln Gly Gln Ala Thr Pro Ser Thr Pro Gly Gln Gln 245 250 255 260	1124
	CAG GTC CTT TCT GGC ACC CTT CTC CCA GGA GCC ACT TTG TGT CAG GAT Gln Val Leu Ser Gly Thr Leu Leu Pro Gly Ala Thr Leu Cys Gln Asp 265 270 275	1172
45	CAA GGT ATG CCT GGA ACA TCC GGA GTT CCT GGA CAG CAG GGA CAG TCT Gln Gly Met Pro Gly Thr Ser Gly Val Pro Gly Gln Gln Gly Gln Ser 280 285 290	1220
50	AGT GGA CAG TGT TGT GCC CCT CAG ATT CCA AAC CCT GTC ATG CCG CCA Ser Gly Gln Cys Cys Ala Pro Gln Ile Pro Asn Pro Val Met Pro Pro 295 300 305	1268
55	TCC ATG AAC ATT AGT GGA AAT GGG TAT CCT TCT TCT ACC GCA TAC AGC Ser Met Asn Ile Ser Gly Asn Gly Tyr Pro Ser Ser Thr Ala Tyr Ser 310 315 320	1316
	CCA AAC CTC GGA TCA CTG GGA TCC TGT GTT GAC ATA CAG AAG ACG GGG Pro Asn Leu Gly Ser Leu Gly Ser Cys Val Asp Ile Gln Lys Thr Gly 325 330 335 340	1364

	GGG ACA TCC TGC GAG CAA AAA CCC GAG AAG TCC GCC ACG CAG TAT GCC	1412
	Gly Thr Ser Cys Glu Gln Lys Pro Glu Lys Ser Ala Thr Gln Tyr Ala	
	345 350 355	
5	ATG GAG GCC TGT GCA ACA CCA ACA CCA ACG GTT ATT ATA GGC AAC AGC	1460
	Met Glu Ala Cys Ala Thr Pro Thr Pro Thr Val Ile Ile Gly Asn Ser	
	360 365 370	
10	GAG TAT CTT GTT GGA CCA GGA ATG TAC AAT GCA ATT AAC TCT CCA TGC	1508
	Glu Tyr Leu Val Gly Pro Gly Met Tyr Asn Ala Ile Asn Ser Pro Cys	
	375 380 385	
15	AAC ACT GCT GTC CAA TGC TGC TAG GCTAAAATAA AACGAGTTTA ATCTTCTTTT	1562
	Asn Thr Ala Val Gln Cys Cys	
	390 395	
	TCTTCGGTCT TTTGGAACGT TGGATGGGGA TGGAGGAGTC TATGGGCTGA AGTGAAATGC	1622
20	CAACACTTCT TCTGCCCAAG AACACATTCG GATGTTCTTC CTGTGGCCAG GAGTTTGGTA	1682
	ACAGGATTCC CCGAGGATTT AGCAGCCTTG GAGTACCATG ATTGAATCAG TATTAAACTT	1742
	CTCAAATTAT TTTATTCTTT CTGTTTATA TCCCGAGCCA ATCTGAGAAG AATGCCTCGA	1802
25	ATTCAAGCTC CCTTAGAAGT GTGGGATC	1830

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:2 :

- 30 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR:
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRIN: double
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- 35 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN
- (ix) CARACTERISTIQUES
- (A) NOM/CLE:
 - (B) EMPLACEMENT:
- 40 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCES: SEQ ID NO:2 :

	AAGCTTCTGA ACAAGCGCTA ACCCTCTTTC AGAATATATA AAGCAATCCA TACAACTTCT	60
45	CCATCCATCC CGGTGCTGTT TCTTTGGAGG CAAAACAGAG GAGGTGGCGA TATCGATGGT	120
	GCATCCATAA TATATACAAG ACACTCCAGG CTGCAACTGA ATCAACACAC TCCATCCCCT	180
	CAGGAAGTCG GTAAACTTGC CTTGAAAATA GCCAATGGAT GTCTCCAGGC TTTATACCAT	240
50	GCACAGCTAT ATCTTGGCCT GAAGTGC ACT TTCAGGTGGG GCTTTGTTAC ATTGCGGTGT	300
	TTTGGATTAC CTGATATAAT TTGTTACCCA CTGAGTCAAG TCGAAACCAG TAGTCCGCAG	360
	ATTTCTAACA GAGAGGAAAG ACTGGAGGTA ATTTGTGGCT TTTGAAACAT GCACAGCAAA	420
55	ATAAAATATA AAAGAAGCCT TTTGCACACT ACCAAAG ATG TTG TTA CTT CTC GCC	475
	Met Leu Leu Leu Leu Ala	
	1 5	

	ATA	ACT	GCT	GTT	GTT	AGC	GCC	ACG	ATG	GTC	CAT	CCT	TCA	GCT	GTT	GTT	523
	Ile	Thr	Ala	Val	Val	Ser	Ala	Thr	Met	Val	His	Pro	Ser	Ala	Val	Val	
				10					15					20			
5	CCA	CAG	CCC	GCA	GCA	CCT	CTC	CAT	GTC	GTT	CCC	CCA	CAG	CAG	CAA	ATG	571
	Pro	Gln	Pro	Ala	Ala	Pro	Leu	His	Val	Val	Pro	Pro	Gln	Gln	Gln	Met	
			25					30					35				
10	GGC	ATG	GTT	AAC	GGA	TGC	ACC	AGC	AAG	AAA	CTA	GAG	GGT	GCA	GAA	ATA	619
	Gly	Met	Val	Asn	Gly	Cys	Thr	Ser	Lys	Lys	Leu	Glu	Gly	Ala	Glu	Ile	
		40					45					50					
15	ATG	AGA	AGG	AAC	ATG	ATT	GAG	TGC	CAG	AAA	AGA	AGC	TCG	GAG	GCA	ACA	667
	Met	Arg	Arg	Asn	Met	Ile	Glu	Cys	Gln	Lys	Arg	Ser	Ser	Glu	Ala	Thr	
	55					60					65					70	
	AAG	GCG	ATG	ATT	GAA	AGG	GCA	AAT	GAA	AAG	GCT	GTA	GAA	TCA	TTC	AAC	715
	Lys	Ala	Met	Ile	Glu	Arg	Ala	Asn	Glu	Lys	Ala	Val	Glu	Ser	Phe	Asn	
					75					80					85		
20	AAG	GAA	GTT	AGC	AAA	GGA	CCT	AGC	CAA	AAG	GAT	GGA	GGC	CAG	TGC	ATA	763
	Lys	Glu	Val	Ser	Lys	Gly	Pro	Ser	Gln	Lys	Asp	Gly	Gly	Gln	Cys	Ile	
				90					95					100			
25	GAA	AAA	GCT	GTA	CAA	GGT	ACC	GAT	AGG	TGT	ATT	CTC	GCT	GGA	ATA	ATC	811
	Glu	Lys	Ala	Val	Gln	Gly	Thr	Asp	Arg	Cys	Ile	Leu	Ala	Gly	Ile	Ile	
			105					110					115				
30	GAT	AAG	GCG	GTG	AAC	AAG	CGC	AAG	TAC	AGA	ATC	TCA	GAT	GTG	GAG	AAC	859
	Asp	Lys	Ala	Val	Asn	Lys	Arg	Lys	Tyr	Arg	Ile	Ser	Asp	Val	Glu	Asn	
		120					125					130					
	AGC	ACC	TCG	CTC	TAC	AGA	GGA	GAC	AAG	CTA	ATT	GCC	CTA	ATT	GTC	AAT	907
	Ser	Thr	Ser	Leu	Tyr	Arg	Gly	Asp	Lys	Leu	Ile	Ala	Leu	Ile	Val	Asn	
35						140					145					150	
	GTC	GAC	TAT	GGG	CTG	CAG	CCG	ATC	ACT	AAG	CCA	AAG	AAG	AAG	AAG	TCC	955
	Val	Asp	Tyr	Gly	Leu	Gln	Pro	Ile	Thr	Lys	Pro	Lys	Lys	Lys	Lys	Ser	
					155					160					165		
40	AAG	ATA	ATG	GCG	AAT	CTC	CCT	CAG	CCG	AAG	AGA	GAG	ATG	TAT	TTC	AAC	1003
	Lys	Ile	Met	Ala	Asn	Leu	Pro	Gln	Pro	Lys	Arg	Glu	Met	Tyr	Phe	Asn	
				170					175					180			
45	CAA	ATC	GGT	CAG	CTT	GTT	GGA	GCA	AGA	GGA	ACG	TTC	CCC	CAG	GAA	AAC	1051
	Gln	Ile	Gly	Gln	Leu	Val	Gly	Ala	Arg	Gly	Thr	Phe	Pro	Gln	Glu	Asn	
			185					190					195				
	AAG	GAG	GAC	TGC	AAG	CCT	TGT	GAG	GGT	CCC	AAG	AAG	ACT	GTT	GAA	ACT	1099
50	Lys	Glu	Asp	Cys	Lys	Pro	Cys	Glu	Gly	Pro	Lys	Lys	Thr	Val	Glu	Thr	
		200					205					210					
	ACT	TCT	GAG	AAA	TGT	AAT	CTT	GGG	TGC	GAG	CTT	AAA	GGA	ACA	TCT	GCT	1147
	Thr	Ser	Glu	Lys	Cys	Asn	Leu	Gly	Cys	Glu	Leu	Lys	Gly	Thr	Ser	Ala	
55						220					225					230	
	CTG	ATA	AGC	AAG	GCC	ATA	CAG	AAG	AAG	GAA	GTC	AAG	GAC	ACG	AAG	GAA	1195
	Leu	Ile	Ser	Lys	Ala	Ile	Gln	Lys	Lys	Glu	Val	Lys	Asp	Thr	Lys	Glu	
					235					240					245		

	GGG GAG AAA AGT GCA AGC CAG GAC TCT GAT GGC GAG GGC ACT GCT GAG	1243
	Gly Glu Lys Ser Ala Ser Gln Asp Ser Asp Gly Glu Gly Thr Ala Glu	
	250 255 260	
5	GAT GCG GAA GTA CAG CAA CCT TCT GCG GAC GGC GAG GGT CTA GAG TAA	1291
	Asp Ala Glu Val Gln Gln Pro Ser Ala Asp Gly Glu Gly Leu Glu	
	265 270 275	
10	TTTTTAAATT AAAATCTCCC TGGATTGAAT CTTCAAGTGC TTTTGTGAAA GACTTTGGGA	1351
	ACATTTTCGTG AAGGCTAACA TAAATTGTTA ATCTCAGGTC ACTCGATGGA ATAGTCAATT	1411
	CGTATTTTCCT TTCCTTGGAT GGTCTGCCCC ACCAGCCTGT TCCTGGCAGT TATCGCATCG	1471
15	TCGACAGAGT CAAACTGAAC GAATCCATAT CCTTTGGACA TCTTCTTGTA TTGGTCGTAG	1531
	ACTATTACTA CCCGATAGTT CAGTATCTCA CTGATCCTCT CCTTGAGAAG GTCTCTAACG	1591
20	TCGTCTTCGG TTATGTGTGC TCCCAGCCCA AATATCCCTA TCGCCCTGGA GGGAGACCCG	1651
	TTTCTCTTTG CTTTAAGTGC ATATCTTTTCG TTTTATAGG AGCTTGGATC TGTTCCTTCG	1711
	TATCCCCTTG TCGGGCGCTC CACCTCGAG	1740
25		

FEUILLE DE RECTIFICATION

FEUILLE AVANT RECTIFICATION

REVENDECATIONS

1) Protéine complète purifiée de tube polaire de microsporidie.

5

2) Protéine selon la revendication 1, caractérisée en ce que sa masse moléculaire apparente est d'environ 55 kDa et son point isoélectrique de l'ordre de 5.

10

3) Protéine selon la revendication 1, caractérisée en ce que sa masse moléculaire apparente est d'environ 35 kDa et un point isoélectrique de l'ordre de 9.

15

4) Protéine selon la revendication 1 dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No:1, un fragment ou un dérivé fonctionnellement équivalent de celle-ci.

20

5) Protéine selon la revendication 4, constituée par ou comprenant le séquence comprise entre les acides aminés en position 23 et 395 de la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No:1.

25

6) Protéine selon la revendication 1 dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No:2, un fragment ou un dérivé fonctionnellement équivalent de celle-ci.

30

7) Protéine selon la revendication 6, constituée par ou comprenant le séquence comprise entre les acides aminés en position 1 et 277 de la séquence

35

FEUILLE AVANT RECTIFICATION

représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No:2.

5 8) Anticorps poly ou monoclonaux dirigés contre au moins une protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 7.

10 9) Procédé de diagnostic des infections provoquées par les microsporidie du genre *Encephalitozoon* comprenant les étapes suivantes :

a) on immobilise une protéine recombinante de tube polaire de microsporidie selon l'une des revendications 1 à 7 sur un support d'analyse,

15 b) on sature les sites aspécifiques de réaction,

c) on incube le produit obtenu à l'étape (b) avec les anticorps du sérum d'un sujet à tester,

d) on élimine par lavage les anticorps du sérum qui ne sont pas complexés à l'étape (c),

20 e) on incube le produit de l'étape (d) avec des anticorps secondaires anti-humains couplés à une molécule permettant leur révélation,

f) on élimine par lavage les anticorps anti-humains qui ne sont pas liés spécifiquement et

25 g) on révèle par tout moyen approprié les complexes anticorps anti-humains / anticorps du sérum / protéine formés à l'étape (e).

30 10) Kit de diagnostic pour la mise en oeuvre d'un procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il est constitué par ...

- un support d'analyse sur lequel sont immobilisées des protéines recombinantes de tube polaire de microsporidie,

- une solution contenant des anticorps anti-humains couplés à une molécule permettant leur révélation, et

- une notice décrivant les étapes du procédé de diagnostic selon la revendication 9.

11) Molécule d'acide nucléique comprenant ou constituée par une séquence nucléique codant pour une protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 7.

12) Molécule d'acide nucléique selon la revendication 11 comprenant ou constituée par la séquence comprise entre les nucléotides 1 et 1830 de la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:1 ou sa séquence complémentaire.

13) Molécule d'acide nucléique selon la revendication 11 comprenant ou constituée par la séquence comprise entre les nucléotides 1 et 1740 de la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:2 ou sa séquence complémentaire.

14) Vecteur comprenant au moins une molécule d'acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 11 à 13, avantageusement associée à des séquences de contrôle.

15) Un hôte transformé par une molécule d'acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 11 à 13 ou par un vecteur selon la revendication 14.

FEUILLE AVANT RECTIFICATION

16) Procédé de production ou d'expression dans un hôte d'une protéine de tube polaire de microsporidie selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il consiste :

5 - à transférer une molécule d'acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 11 à 13 ou un vecteur selon la revendication 14 dans un hôte cellulaire,

10 - à cultiver ledit hôte cellulaire dans des conditions permettant la production de la protéine de tube polaire de microsporidie,

 - à isoler, par tous moyens appropriés les dites protéines.

15 17) Une sonde nucléique éventuellement marquée constituée de tout ou partie d'une molécule d'acide nucléique selon l'une quelconques des revendications 11 à 13.

20 18) Procédé de diagnostic des infections provoquées par les microsporidies du genre *Encephalitozoon*, comprenant les étapes suivantes :

25 a) on extrait de l'ADN de spores microsporidiennes prélevées dans des échantillons biologiques,

 b) on amplifie l'ADN extrait par tout moyen approprié,

 c) on immobilise les produits d'amplification sur un support d'analyse,

30 d) on détermine l'origine microsporidienne des produits d'amplification par hybridation à l'aide d'une sonde nucléotidique marquée spécifique d'une microsporidie.

19) Un kit de diagnostic pour la mise en oeuvre d'un procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il est constitué par :

5 - les moyens nécessaires à l'amplification des séquences à analyser,

 - un support d'analyse pour fixer les produits de l'amplification,

 - des sondes génériques et/ou spécifiques marquées, et

10 - une notice décrivant les étapes du procédé de diagnostic selon la revendication 18.

supprimée

19) Un kit de diagnostic pour la mise en oeuvre d'un procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il est constitué par :

5

- les moyens nécessaires à l'amplification des séquences codant pour les protéines de tube polaire de microsporidie,

- un support d'analyse pour fixer les produits de l'amplification, et

10

- des sondes marquées spécifiques d'une microsporidie.

REVENDICATIONS

FEUILLE RECTIFIÉE

Date d'ajout 03/10/02

1) Protéine purifiée de tube polaire de microsporidie dont la séquence en acides aminés est choisie parmi les séquences représentées dans la liste de séquences en annexe sous les numéros SEQ ID No:1 et SEQ ID No:2 un fragment ou un dérivé fonctionnellement équivalent de celles-ci.

2) Protéine selon la revendication 1, caractérisée en ce que sa masse moléculaire apparente est d'environ 55 kDa et son point isoélectrique de l'ordre de 5.

3) Protéine selon la revendication 1, caractérisée en ce que sa masse moléculaire apparente est d'environ 35 kDa et un point isoélectrique de l'ordre de 9.

4) Protéine selon la revendication 1, constituée par ou comprenant le séquence comprise entre les acides aminés en position 23 et 395 de la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No:1.

5) Protéine selon la revendication 1, constituée par ou comprenant le séquence comprise entre les acides aminés en position 1 et 277 de la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No:2.

6) Anticorps poly ou monoclonaux dirigés contre au moins une protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 5.

7) Procédé de diagnostic des infections provoquées par les microsporidie du genre *Encephalitozoon* comprenant les étapes suivantes :

03/10/02

- a) on immobilise une protéine recombinante de tube polaire de microsporidie selon l'une des revendications 1 à 5 sur un support d'analyse,
- b) on sature les sites spécifiques de réaction,
- c) on incube le produit obtenu à l'étape (b) avec les anticorps du sérum d'un sujet à tester,
- d) on élimine par lavage les anticorps du sérum qui ne sont pas complexés à l'étape (c),
- e) on incube le produit de l'étape (d) avec des anticorps secondaires anti-humains couplés à une molécule permettant leur révélation,
- f) on élimine par lavage les anticorps anti-humains qui ne sont pas liés spécifiquement et
- g) on révèle par tout moyen approprié les complexes anticorps anti-humains / anticorps du sérum / protéine formés à l'étape (e).
- 8) Kit de diagnostic pour la mise en oeuvre d'un procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il est constitué par :
- un support d'analyse sur lequel sont immobilisées des protéines recombinantes de tube polaire de microsporidie,
 - une solution contenant des anticorps anti-humains couplés à une molécule permettant leur révélation, et
 - une notice décrivant les étapes du procédé de diagnostic selon la revendication 7.
- 9) Molécule d'acide nucléique comprenant ou constituée par une séquence nucléique codant pour une protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 5.
- 10) Molécule d'acide nucléique selon la revendication 9 comprenant ou constituée par la séquence comprise entre les nucléotides 1 et 1830 de la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:1 ou sa séquence complémentaire.

08/10/02

11) Molécule d'acide nucléique selon la revendication 9 comprenant ou constituée par la séquence comprise entre les nucléotides 1 et 1740 de la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:2 ou sa séquence complémentaire.

12) Vecteur comprenant au moins une molécule d'acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, avantageusement associée à des séquences de contrôle.

13) Un hôte transformé par une molécule d'acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 9 à 11 ou par un vecteur selon la revendication 12.

14) Procédé de production ou d'expression dans un hôte d'une protéine de tube polaire de microsporidie selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il consiste :

- à transférer une molécule d'acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 9 à 11 ou un vecteur selon la revendication 12 dans un hôte cellulaire,
- à cultiver ledit hôte cellulaire dans des conditions permettant la production de la protéine de tube polaire de microsporidie,
- à isoler, par tous moyens appropriés les dites protéines.

15) Une sonde nucléique éventuellement marquée constituée de tout ou partie d'une molécule d'acide nucléique selon l'une quelconques des revendications 9 à 11.

16) Procédé de diagnostic des infections provoquées par les microsporidies du genre *Encephalitozoon*, comprenant les étapes suivantes :

a) on extrait de l'ADN de spores microsporidiennes prélevées dans des échantillons biologiques,

b) on amplifie l'ADN extrait par tout moyen approprié,

c) on immobilise les produits d'amplification sur un support d'analyse,

d) on détermine l'origine microsporidienne des produits d'amplification par hybridation à l'aide d'une sonde nucléotidique marquée spécifique d'une microsporidie.

17) Un kit de diagnostic pour la mise en oeuvre d'un procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'il est constitué par :

- les moyens nécessaires à l'amplification des séquences codant pour les protéines de tube polaire de microsporidiae,

- un support d'analyse pour fixer les produits de l'amplification,

- des sondes marquées spécifiques d'une microsporidiae.

Fig.1

BEST AVAILABLE COPY

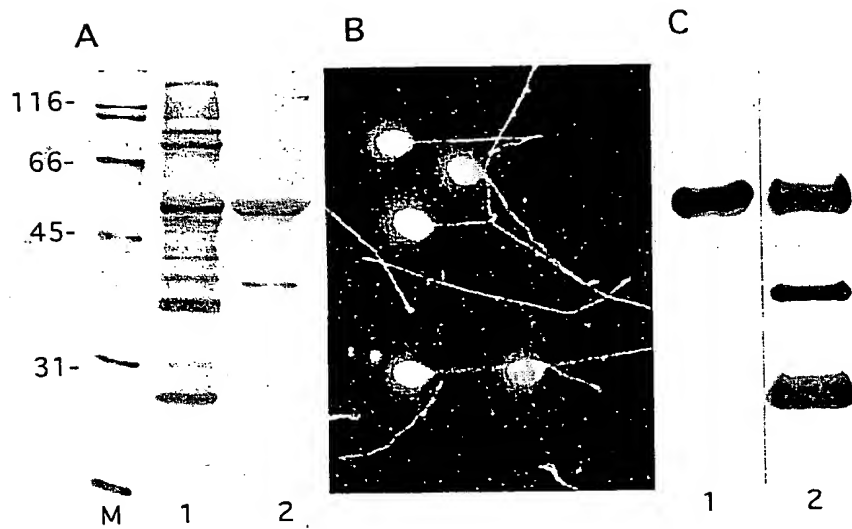


Fig.2

BEST AVAILABLE COPY

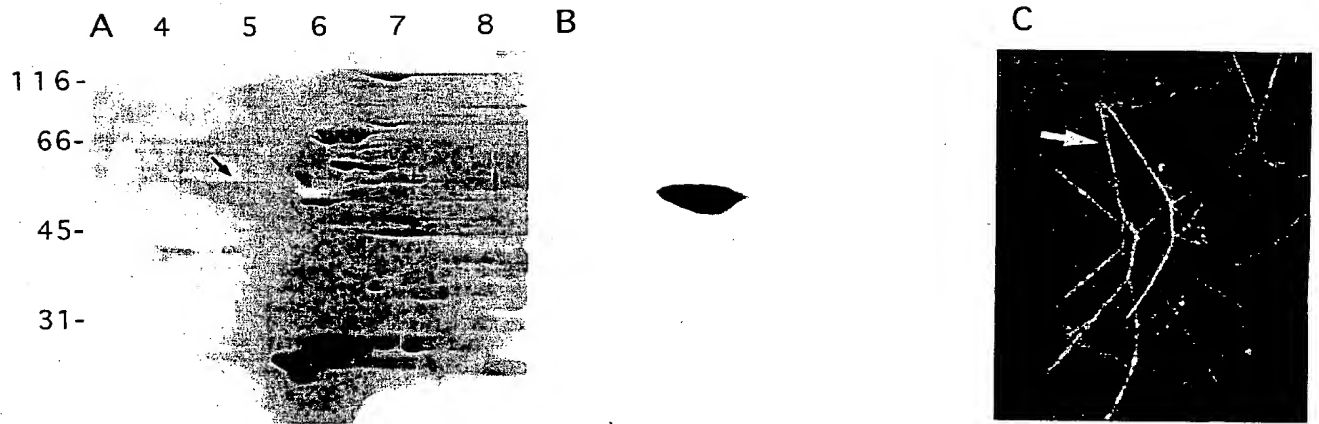


Fig.3

BEST AVAILABLE COPY

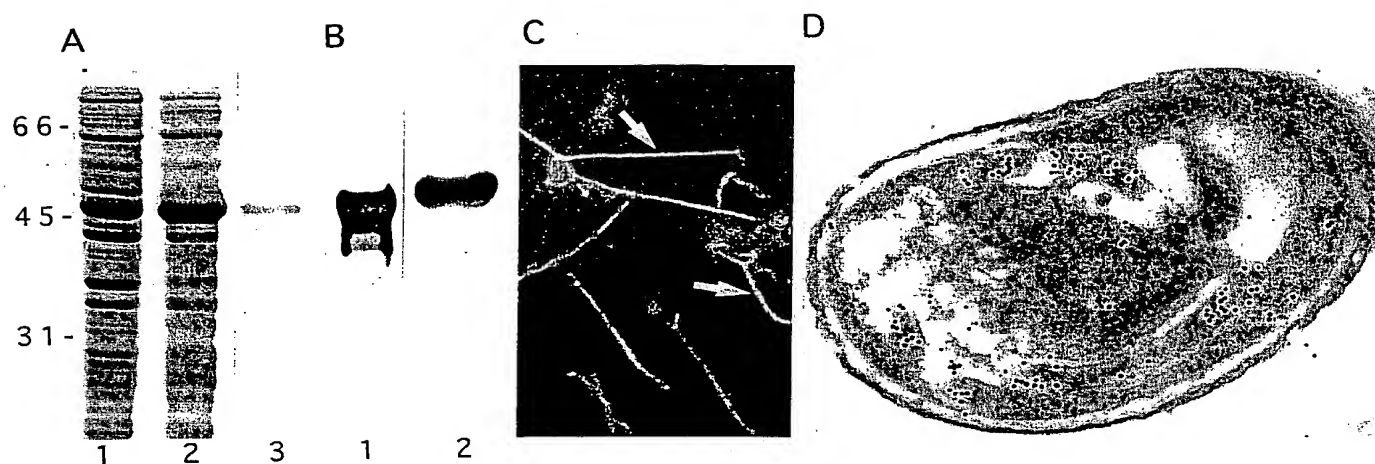


Fig.4

BEST AVAILABLE COPY

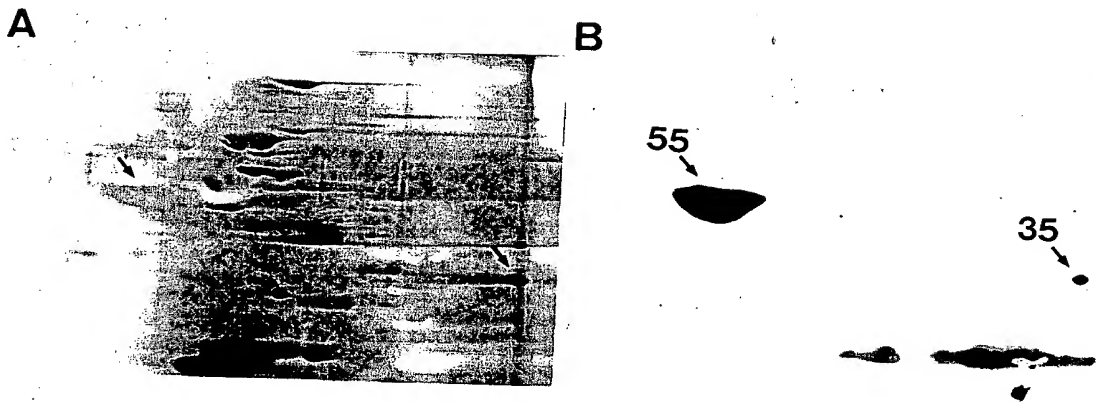
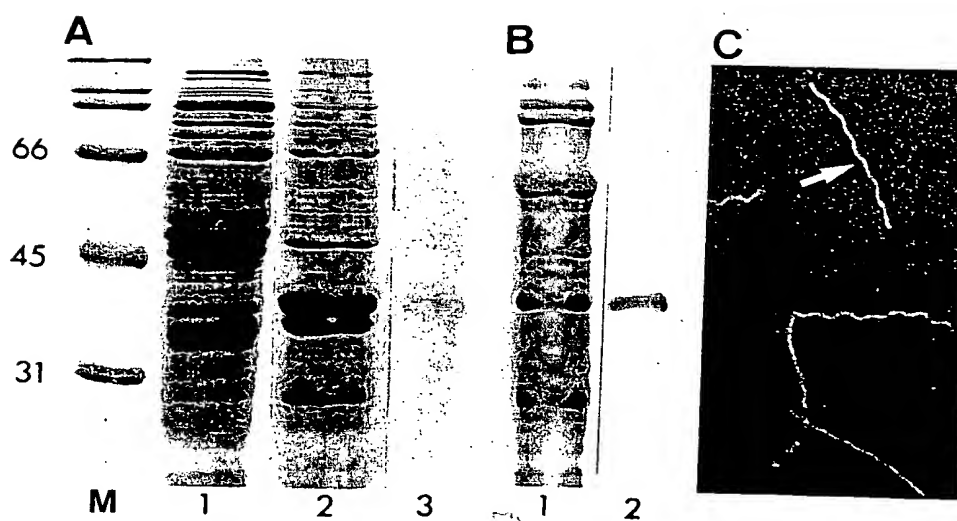


Fig.5

BEST AVAILABLE COPY



THIS PAGE BLANK (USPTO)